

06-13-02

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 37 04 004 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 37 04 004.9
㉑ Anmeldetag: 10. 2. 87
㉒ Offenlegungstag: 18. 8. 88

⑤ Int. Cl. 4:
A 01 N 63/00

A 23 L 3/34
A 61 K 7/00
A 61 K 47/00
A 24 B 15/30
A 23 K 3/00
B 65 D 65/38

DE 3704004 A 1

⑤ // A23L 1/24, A23G 3/00, A23L 1/187, A61K 7/48, 9/10, A23C 19/02 (C12N 9/00, C12R 1:465) A23B 4/00, A23L 1/31, 1/325, 1/32, A23B 7/14, A23L 2/18, C12H 1/14, A23C 3/08, A21D 2/00

⑦1 Anmelder:
Hoechst AG, 6230 Frankfurt, DE

⑦2 Erfinder:
Lück, Erich, Dr., 6232 Bad Soden, DE; Klug, Christian, Dr., 6231 Schwalbach, DE; Lotz, Andreas, Dr., 6000 Frankfurt, DE; Wöhner, Gerhard, Dr., 6093 Flörsheim, DE; Rymon Lipinski, Gert-Wolfhard von, Dr., 6230 Frankfurt, DE

⑤4 Zubereitung zur Verlängerung der Haltbarkeit von Lebensmitteln, Arzneimitteln und kosmetischen Produkten

Die Kombination von nicht-enzymatischen Konservierungsstoffen mit Enzymen, die N-Acetylmuramidaseaktivität besitzen, führt zu einem Wirkungssynergismus, der sich darin auszeichnet, daß insbesondere Lebensmittel, pharmazeutische und kosmetische Produkte sowie Verpackungsmaterialien, Tabak und Tabakerzeugnisse vergleichsweise länger konserviert werden können als mit Hilfe der einzelnen Komponenten.

BEST AVAILABLE COPY

DE 37 04 004 A 1

Patentansprüche

1. Zubereitung enthaltend einen oder mehrere nicht-enzymatische Konservierungsstoffe sowie ein oder mehrere Enzyme mit N-Acetylmuramidaseaktivität in einem Gewichtsverhältnis von 1 zu 100 bis 100 zu 1.
2. Zubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der nicht-enzymatische Konservierungsstoff und das Enzym mit N-Acetylmuramidaseaktivität in einem Gewichtsverhältnis von 1 zu 50 bis 50 zu 1 gemischt werden.
3. Zubereitung nach Anspruch 1 oder 2, enthaltend Benzoesäure und/oder Sorbinsäure oder deren Salze sowie Lysozym und/oder bakterienlysierende Enzymprodukte aus Streptomyceten.
4. Verwendung der Zubereitung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3 als Konservierungsmittel.
5. Verwendung nach Anspruch 4 in Lebensmitteln, kosmetischen und pharmazeutischen Produkten, Verpackungsmaterialien, Tabak und Tabakerzeugnissen sowie Futtermitteln.
6. Verwendung nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß dem zu konservierenden Produkt die Zubereitung in einer Menge zugesetzt wird, daß 0,01 bis 2000 U des Enzyms mit N-Acetylmuramidaseaktivität pro mg darin enthalten sind.
7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß 0,1 bis 1000 U/mg enthalten sind.
8. Verfahren zur Herstellung der Zubereitung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der nichtenzymatische Konservierungsstoff und das Enzym mit N-Acetylmuramidaseaktivität in eine geeignete Applikationsform gebracht werden.

Beschreibung

Konservierungsstoffe, wie beispielsweise Sorbinsäure, Benzoesäure, Propionsäure, Ameisensäure, p-Hydroxybenzoesäure, Salicylsäure und schweflige Säure werden bekanntlich zur Verlängerung der Haltbarkeit von Lebensmitteln, Arzneimitteln und kosmetischen Produkten eingesetzt. In der Praxis der Lebensmittelkonservierung verstärkt man oft die Wirkung der genannten Konservierungsstoffe durch Zusätze, welche die Wasseraktivität oder den pH-Wert der Lebensmittel erniedrigen, wie Kochsalz, Zucker, Essigsäure oder andere Genußsäuren. Dies kann zu geschmacklichen Veränderungen der Lebensmittel führen, die nicht immer erwünscht sind. Im Falle von Mayonnaisen und Fischmarinaden sowie anderen Feinkostprodukten bevorzugt der Verbraucher mild eingestellte Produkte mit geringem Salz- und Essigzusatz. Allerdings besteht im höheren pH-Bereich die Gefahr, daß sich manche Bakterien verstärkt vermehren und daß sogar für pathogene Keime günstige Lebensbedingungen geschaffen werden. Es treten immer wieder Fälle von Lebensmittelvergiftungen auf, die mit dem Verzehr von nur schwach angesäuerten Produkten in Zusammenhang gebracht werden, da die antimikrobielle Wirkung vieler Konservierungsstoffe mit steigendem pH-Wert deutlich abnimmt.

Enzyme mit N-Acetylmuramidaseaktivität, wie z. B. Lysozym, können ebenfalls zur Konservierung von Lebensmitteln, z. B. Milch-, Fleisch- und Fischprodukten, eingesetzt werden. Mit Hilfe des Verfahrens der Britischen Patentschrift 20 14 032 wird das Wachstum von Mikroorganismen in Milchprodukten durch Konservierung mit Lysozym verhindert. In der Französischen Patentschrift 80 03 321 wird der Einsatz von lysozymartigen Produkten aus Sekreten von Tieren und Pflanzen zur Verhinderung der Spätblähung in verschiedenen Käsesorten dargestellt.

Derartige Produkte können jedoch nicht nur aus Pflanzen und Tieren gewonnen werden, sondern auch aus Streptomyceten wie den deutschen Offenlegungsschriften 20 11 935, 20 40 444, 21 46 597 und 34 40 735 zu entnehmen ist.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß die Kombination der nicht-enzymatischen Konservierungsstoffe mit Enzymen, die N-Acetylmuramidaseaktivität besitzen, zu einem Wirkungssynergismus führen, der sich darin auszeichnet, daß insbesondere Lebensmittel, Arzneimittel und kosmetische Produkte mit der Mischung vergleichsweise länger konserviert werden können als mit Hilfe der einzelnen Komponenten.

Die Erfindung betrifft somit:

1. Eine Zubereitung enthaltend einen oder mehrere nicht-enzymatische Konservierungsstoffe und ein oder mehrere Enzyme mit N-Acetylmuramidaseaktivität in einem Gewichtsverhältnis von 1 zu 100 bis 100 zu 1.
2. Die unter 1. charakterisierte Zubereitung zur Anwendung als Konservierungsmittel.
3. Ein Verfahren zur Herstellung der unter 1. charakterisierten Zubereitung, das dadurch gekennzeichnet, daß der nicht-enzymatische Konservierungsstoff und das Enzym mit N-Acetylmuramidaseaktivität in eine geeignete Applikationsform gebracht werden.

Im folgenden wird die Erfindung insbesondere in ihren bevorzugten Ausführungsformen detailliert beschrieben.

Ferner wird die Erfindung in den Patentansprüchen charakterisiert.

Geeignete Konservierungsstoffe, die erfindungsgemäß als Wirksubstanzen in der Zubereitung eingesetzt werden, sind beispielsweise Sorbinsäure, Benzoesäure, Propionsäure, Ameisensäure, p-Hydroxybenzoesäure, Salicylsäure und schweflige Säure sowie deren Salze. Besonders gute Ergebnisse können mit Benzoesäure oder Sorbinsäure oder deren Salzen erzielt werden. Die zweite Wirkkomponente der Zubereitung ist ein Enzym mit N-Acetylmuramidaseaktivität, das die Fähigkeit besitzt, Bakterienzellen zu lysieren und eine weitere Vermehrung der Mikroorganismen zu verhindern. Bevorzugt geeignete Enzyme sind beispielsweise Lysozym, insbesondere aus Hühnereiweiß, oder bakterienlysierende Enzymprodukte aus Streptomyceten, insbesondere aus *Streptomyces coelicolor* DSM 3030 sowie dessen Mutanten und Varianten. Das Enzymprodukt aus DSM 3030 gewinnt man leicht nach dem in der Deutschen Offenlegungsschrift 34 40 375 beschriebenen Verfahren. Danach

wird *Streptomyces coelicolor* DSM 3030 in einem Fermentationsmedium unter Zusatz von Zuckerrübenmelasse in einer Menge von 5 bis 50 g, vorzugsweise 10 bis 20 g, pro Liter Kulturmedium kultiviert. Eine weitere Ausbeutesteigerung wird erreicht, wenn man dem Kulturmedium Calciumionen in Form leicht löslicher, ungiftiger Calciumsalze zusetzt, vorzugsweise in Form des preiswerten Calciumchlorids. Vorteilhaft ist eine 0,05- bis 1 molare Calciumionenkonzentration, besonders bevorzugt sind Konzentrationen von 100 bis 500 mmol, beispielsweise in Form eines Zusatzes von 0,2 bis 0,5 Gew.-% an Calciumchlorid-Dihydrat.

Die Wirksubstanzen können gleichzeitig oder aufeinanderfolgend Lebensmitteln, wie z. B. Fleisch und Fleischerzeugnissen, Fisch-, Krusten-, Schalen- und Weichtierzeugnissen, eßbaren gelatineartigen Überzugsmassen für Fleischerzeugnisse, Feinkosterzeugnissen, Flüssigei und flüssigem Eigelb, Gemüse- und Obsterzeugnissen, alkoholischen und alkoholfreien Getränken, Milch und Milcherzeugnissen, Füllungen für Teige und Backwaren, Zucker- und Süßwaren, sowie pharmazeutischen und kosmetischen Produkten, Futtermitteln, Tabak, Tabakerzeugnissen und Verpackungsmaterialien zugegeben werden.

Je nach Anwendungszweck werden ein oder mehrere Enzyme mit N-Acetylmuramidaseaktivität mit mindestens einem der nicht-enzymatischen Konservierungsstoffe in einem Gewichtsverhältnis von 1 zu 100 bis 100 zu 1, vorzugsweise 1 : 50 bis 50 : 1, gemischt und dem zu konservierenden Produkt nach herkömmlichen Verfahren zugesetzt. Die Zugabe der Mischung erfolgt in einer Größenordnung, daß 0,01 bis 2000 U des Enzyms mit N-Acetylmuramidaseaktivität, vorzugsweise 0,1 bis 1000 U, pro mg des zu konservierenden Produkts darin enthalten sind.

Die Kombination von chemischen Konservierungsstoffen und Enzymen mit Muramidaseaktivität führt zu einem Wirkungssynergismus. Dies wirkt sich besonders vorteilhaft auf Produkte mit einem milden pH-Wert aus, die beim Verbraucher besonders beliebt sind. Beispielsweise wirkt die Kombination in einem pH-Bereich zwischen 3 bis 6, vorzugsweise 4,5 bis 5,5, besser gegen lebensmittelverderbende und pathogene Mikroorganismen als die Einzelkomponenten für sich allein. Der Vorteil der Mischung besteht darin, daß man den Gehalt der chemischen Konservierungsstoffe in Lebensmitteln, Kosmetika, Pharmazeutika etc. bei gleichzeitiger Verlängerung der Haltbarkeit reduzieren kann. Selbstverständlich kann oder sollte die erfindungsgemäße Wirkstoffkombination nur dann sinnvoll eingesetzt werden, wenn die zu konservierenden Produkte unter hygienisch einwandfreien Bedingungen hergestellt worden sind und eine niedrige Anfangskeimzahl aufweisen.

In den folgenden Beispielen wird die Erfindung weitergehend erläutert. Die Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht, wenn nicht anders angegeben.

Beispiel 1

Haltbarkeitsuntersuchung von Salat-Mayonnaise

Es wurde eine Salat-Mayonnaise nach folgender Rezeptur hergestellt:

Öl	50,0%
Wasser	31,1
Stärke	3,1%
Eigelb	4,6%
Salz	1,0%
Zucker	4,0%
Guarmehl	0,2%

Der pH-Wert der Salat-Mayonnaise wurde mit Essigsäure auf pH 4,5 eingestellt. Der Ansatz wurde in vier Chargen unterteilt, von denen eine unverändert belassen wurde (I). Den anderen Teilmengen wurden jeweils 100 U Lysozym pro mg (II), 50 U Lysozym pro mg + 0,15% Kaliumsorbat (III) und 0,2% Kaliumsorbat (IV) zugesetzt.

Die Lagerung der Ansätze erfolgte bei einer Temperatur von +10°C in verschlossenen Gläsern.

Die Haltbarkeit wurde anhand sensorisch wahrnehmbarer Veränderungen sowie der Gesamtkeimzahl beurteilt.

Konservierungsstoff-Zusatz		Haltbarkeit [Tage]
I	Kontrollversuch	6
II	100 U Lysozym/mg	12
III	50 U Lysozym/mg + 0,15% Kaliumsorbat	19
IV	0,2% Kaliumsorbat	14

Beispiel 2

Haltbarkeitsuntersuchung von Mayonnaise

Es wurde eine Mayonnaise nach folgender Rezeptur hergestellt:

Öl	82,0%
Wasser	10,0%
Zucker	4,0%
Senf	2,0%
5 Salz	2,0%

Der pH-Wert der Mayonnaise wurde mit Essigsäure auf 4,5 eingestellt. Die Mayonnaise wurde analog zu Beispiel 1 behandelt, gelagert und beurteilt. Es ergaben sich folgende Haltbarkeiten:

	Konservierungsstoff-Zusatz	Haltbarkeit [Tage]
10		
	I Kontrollversuch	9
15	II 100 U Lysozym/mg	15
	III 50 U Lysozym/mg + 0,15% Kaliumsorbat	23
	IV 0,2% Kaliumsorbat	17

20 Beispiel 3

Haltbarkeitsuntersuchung von Fleischsalat

Die in Beispiel 1 hergestellten Salat-Mayonnaisen I–IV wurden mit jeweils 40 Gew.-% feingeschnittener Fleischwurst und 20 Gew.-% feingeschnittenen Salzgurken einer Herstellungsladung vermengt. Die Fleischsalate wurden analog zu Beispiel 1 behandelt, gelagert und beurteilt. Es ergaben sich folgende Haltbarkeiten:

	Konservierungsstoff-Zusatz	Haltbarkeit [Tage]
30		
	I Kontrollversuch	3
	II 40 U Lysozym/mg	6
	III 20 U Lysozym/mg + 0,06% Kaliumsorbat	11
35	IV 0,08% Kaliumsorbat	8

Beispiel 4

40 Haltbarkeitsuntersuchung von Salat-Dressing

Es wurde ein Salat-Dressing nach folgender Rezeptur hergestellt:

Wasser	34,1%
45 Öl	46,1%
Zucker	14,5%
Senf	3,0%
Salz	2,1%
Xanthan	0,2%

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 4,5 eingestellt. Das Salat-Dressing wurde analog zu Beispiel 1 behandelt, gelagert und beurteilt. Es ergaben sich folgende Haltbarkeiten:

	Konservierungsstoff-Zusatz	Haltbarkeit [Tage]
55		
	I Kontrollversuch	6
	II 100 U Lysozym/mg	10
60	III 50 U Lysozym/mg + 0,15% Kaliumsorbat	17
	IV 0,2% Kaliumsorbat	12

65 Beispiel 5

Haltbarkeitsuntersuchung einer Creme-Füllung

Es wurde eine Kuchencreme nach folgender Rezeptur hergestellt:

Zucker	51,2%
Glukosesirup	25,6%
Wasser	22,0%
funktionalisiertes Protein	0,7%
Citronensäure	0,4%
Agar-Agar	0,07%
Aromastoffe	0,03%

5

Die Creme wurde in vier Chargen unterteilt, von denen eine unverändert belassen wurde (I). Den anderen Teilmengen wurden jeweils 100 U Lysozym pro mg (II), 50 U Lysozym pro mg + 0,15% Kaliumsorbat (III) und 0,2% Kaliumsorbat (IV) zugesetzt.

10

Die Lagerung der Ansätze erfolgte bei einer Temperatur von +10°C in verschlossenen Gläsern.

Die Haltbarkeit wurde anhand sensorisch wahrnehmbarer Veränderungen sowie der Gesamtkeimzahl beurteilt.

15

Konservierungsstoff-Zusatz		Haltbarkeit [Tage]
I	Kontrollversuch	5
II	100 U Lysozym/mg	9
III	50 U Lysozym/mg + 0,15% Kaliumsorbat	15
IV	0,2% Kaliumsorbat	11

20

Beispiel 6

25

Haltbarkeitsuntersuchung einer geschäumten Fruchtdessert-Speise

Es wurde eine Fruchtdessert-Speise nach folgender Rezeptur hergestellt:

30

Wasser	74,6%
Puderzucker	18,8%
modifizierte Stärke	3,7%
Instant-Gelatine	1,2%
Fruchtpulver	0,7%
Citronensäure	0,4%
Glucono Delta Lacton	0,3%
Natriumhydrogencarbonat	0,1%
funktionalisiertes Protein	0,1%
Aromastoffe	0,1%

35

40

Die Fruchtdessert-Speise wurde in vier Chargen unterteilt, von denen eine unverändert belassen wurde (I). Den anderen Teilmengen wurden jeweils 100 U Lysozym pro mg (II), 50 U Lysozym pro mg + 0,15% Kaliumsorbat (III) und 0,2% Kaliumsorbat (IV) zugesetzt.

45

Die Lagerung der Ansätze erfolgte bei einer Temperatur von +10°C in verschlossenen Gläsern.

Die Haltbarkeit wurde anhand sensorisch wahrnehmbarer Veränderungen sowie der Gesamtkeimzahl beurteilt.

50

Konservierungsstoff-Zusatz		Haltbarkeit [Tage]
I	Kontrollversuch	6
II	100 U Lysozym/mg	10
III	50 U Lysozym/mg + 0,15% Kaliumsorbat	16
IV	0,2% Kaliumsorbat	11

55

Beispiel 7

60

Haltbarkeitsuntersuchung einer Feuchtigkeitscreme

Es wurde eine Feuchtigkeitscreme nach folgender Rezeptur hergestellt:

Paraffinöl DAB 7	10,0%
Vitaminöl	5,0%
Vaseline DAB 7	5,0%

65

5	⊗Hostacerin T-3 (Fettalkoholpolyglykolether, Emulgator)	5,0%
	⊗Hostaphat KW 340 N (organisches Phosphorsäurederivat, Emulgator)	4,0%
	Palmitinsäure	5,0%
	Cetylalkohol DAB 7	1,0%
	Wasser	60,0%
	⊗Hydroviton (Feuchthaltemittel)	5,0%

Die Creme wurde in vier Chargen unterteilt, von denen eine unverändert belassen wurde (I). Bei der Herstellung der Cremes II–IV wurden der wäßrigen Phase folgende Zusätze zudosiert:

10	Creme II	250 U Lysozym/mg
	Creme III	150 U Lysozym/mg + 0,2% Sorbinsäure
	Creme IV	0,3% Sorbinsäure

15 Die Lagerung der Cremes erfolgte bei Raumtemperatur in verschlossenen Gefäßen.
Die Haltbarkeit wurde anhand sensorisch wahrnehmbarer Veränderungen sowie Gesamtkeimzahl beurteilt.

	Konservierungsstoff-Zusatz	Haltbarkeit [Tage]
20	I Kontrollversuch	9
	II 250 U Lysozym/mg	14
	III 150 U Lysozym/mg + 0,2% Sorbinsäure	30
25	IV 0,3% Sorbinsäure	19

Beispiel 8

30 Haltbarkeitsuntersuchung eines Gels

Es wurde ein pharmazeutisches Gel nach folgender Rezeptur hergestellt:

35	Wasser	97%
	Hydroxyethylcellulose (Tylose H 1000)	3%

Das hergestellte Gel wurde in vier Chargen unterteilt, von denen ein Gel (I) unbehandelt blieb. Den Gelen II–IV wurden folgende Zusätze zudosiert:

40	Gel II	250 U Lysozym pro mg
	Gel III	150 U Lysozym pro mg + 0,2% Sorbinsäure
	Gel IV	0,3% Sorbinsäure

45 Die Lagerung der Gele erfolgte bei Raumtemperatur in verschlossenen Gefäßen.
Die Haltbarkeit wurde anhand sensorisch wahrnehmbarer Veränderungen sowie der Gesamtkeimzahl beurteilt.

	Konservierungsstoff-Zusatz	Haltbarkeit [Tage]
50	I Kontrollversuch	7
	II 250 U Lysozym/mg	19
	III 150 U Lysozym/mg + 0,2% Sorbinsäure	35
55	IV 0,3% Sorbinsäure	22

Beispiel 9

60 Haltbarkeitsuntersuchung von Flüssiglab

Zur Haltbarkeitsuntersuchung wurde im Handel erhältliches Flüssiglab verwendet, das mit 1,1% Benzoesäure konserviert war. Das Flüssiglab wurde ohne und mit Zusatz von 50 000 U Lysozym pro ml bei Raumtemperatur in geschlossenen Gefäßen gelagert.

65 Die Haltbarkeit wurde anhand sensorisch wahrnehmbarer Veränderungen sowie der Gesamtkeimzahl beurteilt.

OS 37 04 004

Konservierungsstoff-Zusatz

Haltbarkeit
[Tage]

1,1% Benzoesäure

16

50 000 U Lysozym/ml + 1,1% Benzoesäure

33

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -